利用 TaqMan 等位基因技术鉴定烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种

姚 晶[1,2], 郭晓军[2], 王 甦[2], 王昱超[2], 罗 晨[2,*], 张 帆[2], 李绍勤[1,*]
(1. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北省昆虫资源利用与害虫可持续治理重点实验室, 武汉 430070;
2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

摘要: MEAM1 和 MED 是烟粉虱 *Bemisia tabaci* 两种重要的外来入侵隐种, 在我国部分地区常混合发生, 对我国农业生产造成了不同程度的危害和损失。尤其是 MED 隐种危害寄主范围更广, 对多种杀虫剂具有较高抗性, 防治上更为困难。因此, 如何快速鉴定烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种, 对于烟粉虱防治策略的选择具有十分重要的意义。本研究选择线粒体细胞色素氧化酶 I(mitochondrial cytochrome oxidase I, mtDNA COI)基因保守区域内的单核苷酸多态性(SNP)为靶标, 应用等位基因聚合酶链式反应技术, 借助 TaqMan-MGB 荧光染色标记探针, 建立了一种鉴定烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种的等位基因选择性 PCR 方法, 并对北京 11 个区县的 14 个烟粉虱种群进行了隐种鉴定。结果表明, 北京地区 14 个烟粉虱种群样本与已知烟粉虱 MED 隐种种群在荧光值分布上聚为一簇, 为 MED 隐种。该鉴定方法具备 SNP 基因分型的优点, 可快速、可靠、高通量地鉴定烟粉虱 MEAM1 和 MED, 为烟粉虱隐种鉴定及遗传分化研究提供了新的可选途径。

关键词: 烟粉虱; 隐种; mtDNA COI; SNP; 等位基因选择性 PCR; 荧光定量
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2013)01-0098-06

Discrimination of cryptic species MEAM1 and MED of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) by using TaqMan allele-selective PCR

YAO Jing[1,2], GUO Xiao-Jun[2], WANG Su[2], WANG Yu-Chao[2], LUO Chen[2,*], ZHANG Fan[2], LI Shao-Qin[1,*] (1. Hubei Insect Resource Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Institute of Plant and Environmental Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: The whitefly *Bemisia tabaci* is considered taxonomically as a species complex which contains some destructive pests worldwide. Two of the most prevalent cryptic species are *B. tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) and Mediterranean (MED). They are invasive cryptic species and often occur in some areas in China. The MED particularly has strong resistance to some insecticides and is more difficult to be controlled. In this study TaqMan allele-selective PCR was used for high-throughput allelic discrimination of MEAM1 and MED. A single nucleotide polymorphism (SNP) in a conservative region of the mitochondrial cytochrome oxidase I (mtDNA COI) gene was selected as the amplification target. The TaqMan-MGB fluorescent dye-labeled was used in real-time quantitative PCR. Fourteen populations of *B. tabaci* collected from Beijing were identified with the method. The results showed that all samples of *B. tabaci* clustered with the known MED species as shown by the higher fluorescence of FAM dye in scatter plot analysis of fluorescence data, suggesting that all Beijing populations examined are MED. The results prove that the method has the advantage of SNP genotyping, with which MEAM1 and MED can be identified rapidly, reliably and high-throughput, and this provides a new alternative way for identification of cryptic species and important information for management strategy selection.

Key words: *Bemisia tabaci*; cryptic species; mtDNA COI; SNP; allele-selective PCR; fluorescent quantitation

---

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2009CB119200); "十二五"科技支撑计划课题(2012BAD19B06)
作者简介: 姚晶, 女, 1989 年生, 吉林省公主岭市人, 硕士研究生, 研究方向为害虫生物防治, E-mail: taiyang062010@163.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: luochen@baafs.net.cn; lishaoqin@mail.hzau.edu.cn
收稿日期 Received: 2012-10-23; 接受日期 Accepted: 2012-12-16

烟粉虱 *Bemisia tabaci*（Gennadius）又名棉粉虱（cotton whitefly）、甘薯粉虱（sweetpotato whitefly），属半翅目（Hemiptera）粉虱科（Aleyrodidae）小粉虱属 *Bemisia*，主要通过直接取食植物汁液、分泌蜜露和传播植物病毒对寄主植物造成危害（Jones，2003）。在过去的 20 年里，烟粉虱一直是农业和园艺的主要灾害性害虫之一（De Barro，1995；Qiu *et al.*，2007）。20 世纪末，烟粉虱在我国北方部分地区暴发为害，对番茄、黄瓜和西葫芦的危害极为严重，造成的经济损失可达七成以上（罗晨等，2000）。近年来的研究表明，烟粉虱是一个正处于快速进化过程的复合种，包含 30 个以上的隐种（Dinsdale *et al.*，2010；De Barro *et al.*，2011；Hu *et al.*，2011）。不同烟粉虱隐种在形态上难以区分，而在危害习性和对化学农药的抗性上有许多差异，分子生物学技术是烟粉虱不同隐种鉴定的重要手段。烟粉虱 MEAM1 和 MED 是入侵我国重要的烟粉虱隐种，在我国部分地区常混合发生并对我国的农业生产造成了不同程度的危害和损失。其中，MED 隐种危害寄主范围更广，且对吡虫啉等新烟碱类杀虫剂有较高抗性，在防治上更为困难（Luo *et al.*，2010）。在烟粉虱综合防治中，首要的任务是鉴别发生为害烟粉虱的隐种种类，并根据不同隐种烟粉虱采取不同的防治策略。因此，寻找快速又可靠的鉴定烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种的方法，对烟粉虱的抗性监测及综合治理都有非常重要的意义。

作为第 3 代 DNA 遗传标记，单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）标记在发现相关基因突变方面发挥了重大作用（杨永强等，2009）。通过比较物种间 SNP 的差异，可了解物种间亲属关系和生物学信息（李亚玲等，2010）。SNP 与传统分子标记方法存在明显不同，不再以 DNA 长度差异作为检测手段，而是直接检测序列变化，从而摆脱凝胶电泳的瓶颈限制，实现高效检测（Mochida *et al.*，2003）。同时，由于 SNP 密度高多态性较丰富，具有高度遗传稳定性，且易于分型，并有利于快速、自动化筛选和检测，以及批量、规模筛选和分析（Wang *et al.*，1998）。本实验以线粒体细胞色素氧化酶 I（mitochondrial cytochrome oxidase I，mtCOI）基因保守区域内的 SNP 为靶标，应用等位基因聚合酶链式反应技术，借助 TaqMan-MGB 荧光染色标记探针来区分烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种；同时，利用该方法对北京 11 个区县的 14 个烟粉虱种群进行了隐种鉴定。

1　材料与方法

1.1　供试材料

已知 4 个实验室种群作为本试验阳性对照，每个种群选取 3 头成虫进行基因型检测，并建立 MEAM1 和 MED 隐种的标准荧光反应曲线。其中，B 种群（寄主植物：甘蓝）由中国农业科学院蔬菜花卉研究所昆虫组提供，经 mtCOI 特异性序列扩增鉴定为 MEAM1 隐种。DX-1（寄主植物：黄瓜）、XDY（寄主植物：一品红）、FST（寄主植物：番茄）种群由本实验室提供，经 mtCOI 特异性序列扩增鉴定为 MED 隐种（罗晨等，2002）。

实验所用的 14 个烟粉虱田间种群采自北京的 11 个区县，详细信息见表 1。田间采集的烟粉虱成虫放置 1.5 mL 离心管中，当天于 －20℃ 冷冻保存备用。每个种群选取 3 头成虫用于实验鉴定。

1.2　烟粉虱 DNA 的提取

取单头烟粉虱个体，置于滴有 50 μL DNAZOL®（Invitrogen）试剂的离心管中研磨，10 000 r/min 离心 10 min 沉淀匀浆，转移上清液至新的离心管中。向管中加入 25 μL 无水乙醇，以 4 000 r/min 离心 2 min，DNA 沉淀，室温晾干。每管加入 50 μL 8 mmol/L NaOH 溶液，溶解后即可用于 PCR 反应，或于 4℃ 保存备用。

1.3　引物与探针

本研究选择 mtCOI 基因序列保守区域内的靶标 SNP 作为基因检测位点，参照文献合成一对引物和两条 TaqMan-MGB 探针（Jones *et al.*，2008）。上游引物 BEMBQ-SNP1F：5′-GCCTTTGATTTACAGGATTTTTATTTTTATTTACTATAGGT-3′；下游引物 BEMBQ-SNP1R：5′-GAAATCAATAGATAACTCCTCCTACAATAGCA-3′。探针 SNP1V2：5′-ATGCAGACACACATC-3′，5′端标记 HEX 荧光基团，3′端标记 NFQ 非荧光猝灭基团及 MGB，用以检测 MEAM1 烟粉虱个体；探针 SNP1M2：5′-ATGCAAACACACATC-3′，5′端标记 FAM 荧光基团，3′端标记 NFQ 非荧光猝灭基团及 MGB，用以检测 MED 烟粉虱个体。当检测 MEAM1 烟粉虱 DNA 时，HEX 染料荧光值增加。当检测 MED 烟粉虱 DNA 时，反应中 FAM 染料的荧光值增加。以上引物和探针均由上海基康生物技术有限公司合成。

1.4　RT-PCR 反应

荧光定量 PCR 反应体系如下：1 μL 模板 DNA，

表 1 北京地区烟粉虱样品来源

Table 1 Samples of *Bemisia tabaci* in Beijing

样品编号 Sample no.	采集地点 Collection location	种群代码 Population code	寄主植物 Host plants	采集时间 Collection date	经度(°E) Longitude	纬度(°N) Latitude
1	海淀魏公村 Weigongcun, Haidian	HD-1	黄瓜 Cucumber	2012.07.31	116.32	39.96
2	海淀板井 Banjing, Haidian	HD-2	茄子 Eggplant	2012.06.28	116.29	39.94
3	朝阳蟹岛 Xiedao, Chaoyang	XDQ	茄子 Eggplant	2011.09.22	116.58	40.00
4	顺义大孙各庄 Dasungezhuang, Shunyi	SY	番茄 Tomato	2011.09.15	116.88	40.10
5	房山韩村河 Hancunhe, Fangshan	FSP	辣椒 Pepper	2011.12.13	116.14	39.75
6	大兴魏善庄 Weishanzhuang, Daxing	DX-2	向日葵 Sunflower	2012.07.20	116.38	39.67
7	丰台花乡 Huaxiang, Fengtai	FT	南瓜 Pumpkin	2012.07.10	116.35	39.83
8	通州永顺 Yongshun, Tongzhou	TZ	向日葵 Sunflower	2012.07.19	116.66	39.92
9	昌平流村 Liucun, Changping	CP-1	茄子 Eggplant	2012.08.04	115.99	40.21
10	昌平南口 Nankou, Changping	CP-2	向日葵 Sunflower	2012.07.13	116.12	40.21
11	平谷南独乐河 Nandulehe, Pinggu	PG	辣椒 Pepper	2012.07.04	117.20	40.24
12	怀柔琉璃庙 Liulimiao, Huairou	HR	黄瓜 Cucumber	2012.08.10	116.59	40.57
13	密云北庄 Beizhuang, Miyun	MY-1	茄子 Eggplant	2012.07.27	117.17	40.51
14	密云十里堡 Shilipu, Miyun	MY-2	向日葵 Sunflower	2012.08.19	116.78	40.35

Real Master Mix (2.5 × Real Master Mix 8 μL, 20 × Probe Enhancer Solution 1 μL)，每种引物 900 nmol/L，每种探针 200 nmol/L，用灭菌水将总体积加至 20 μL。反应条件为二步法，95℃预变性 10 min 后，进行 40 个如下循环：95℃变性 10 s，60℃退火延伸 45 s。实验设无模板对照(no template control, NTC)，以水代替模板 DNA。

1.5 SNP 基因型检测

Eco™ Real-Time PCR 仪(Illumina 公司)实时监测两种染料的荧光值变化，通过荧光定量 PCR 自带软件分析各样品的 HEX 和 FAM 染料的 PCR 扩增结果。根据循环结束后终点荧光信号值的差异，以 HEX 和 FAM 的荧光值为变量，构建双变量散点图，鉴定样品是否为 MEAM1 或 MED 隐种。

1.6 数据统计与分析

运用 Excel 2003 软件对试验数据进行整理和分析，绘制荧光定量散点图。

2 结果与分析

由 RT-PCR 扩增结果显示，空白对照的两个报告基团均未诱导荧光反应，阳性对照中分别代表烟粉虱 MEAM1 和 MED 的 HEX 和 FAM 报告基团均诱导相应的荧光反应，荧光反应曲线如图 1。横坐

标为循环数(number of cycles)，纵坐标为报告基团扩增的荧光值(ΔR)。已知烟粉虱隐种中，DX-1，XDY 和 FST 和 3 个种群属于 MED 隐种，其 FAM 染料的终点荧光值为 0.299 ±0.066，HEX 染料的终点荧光值为 0.031 ±0.007；B 属于 MEAM1 隐种，其 FAM 染料的终点荧光值为 0.034 ±0.002，HEX 染料的终点荧光值为 0.317 ±0.021；NTC 的 FAM 染料的终点荧光值为 0.018 ±0.000，HEX 染料的终点荧光值为 0.007 ±0.001。以 HEX 和 FAM 的终点荧光值为变量，构建荧光定量散点图如图 2。从图 2 可以较直观地看出，DX-1，XDY 和 FST 3 个 MED 隐种种群的试验虫体基因型检测 FAM 的荧光值高而聚为一簇，而 B 种群试验虫体 HEX 的荧光值高而聚为一簇。

用建立的试验反应体系进行未知烟粉虱隐种鉴定，经 RT-PCR 扩增后测定报告基因荧光反应值，其 FAM 染料的终点荧光值为 0.261 ±0.067，HEX 染料的终点荧光值为 0.032 ±0.009。以 FAM 和 HEX 的终点荧光值为变量，构建荧光定量散点图如图 3。从图 3 可以看出，HD-1，HD-2，XDQ，SY，FSP，DX-2，FT，TZ，CP-1，CP-2，PG，HR，MY-1 和 MY-2 这 14 个烟粉虱种群试验虫体的 FAM 染料的荧光值都较高，皆与 MED 隐种阳性对照试验种群聚为一簇，为 MED 隐种。

3　讨论

本研究通过选取烟粉虱 COI 基因保守区域内的一个 SNP 为测试位点，设计 TaqMan 探针，建立了一种鉴定烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种的等位基因选择性 PCR 方法，并对 14 个烟粉虱种群进行了隐种鉴定。结果表明，此种方法可有效鉴定 MEAM1 和 MED 隐种，14 个种群皆为 MED 隐种。20 世纪末 MEAM1 烟粉虱成功入侵我国，并作为优势种群在各地造成严重危害(罗晨等，2000；Qiu *et al.*，2007)。2005 年，我国云南昆明一品红上首次发现 MED 烟粉虱后(褚栋等，2005)，相继在浙江、江苏等地区也发现 MED 烟粉虱。本试验结果表明北京地区发生的烟粉虱主要现以 MED 隐种为主，这与国内一些研究报道有关我国部分地区烟粉虱优势危害种群已由 MEAM1 演替为 MED 的结果相符合(Rao *et al.*，2011；Hu *et al.*，2011)。MED 烟粉虱在许多杂草上比 MEAM1 烟粉虱具有更强的生存优势，在没有药剂选择压力的情况下，其耐药性更强，抗药性更稳定(Rauch and Nauen，2003)。因此，烟粉虱 MED 隐种的发生和危害，以及与 MEAM1 隐种的种群替代问题值得关注。

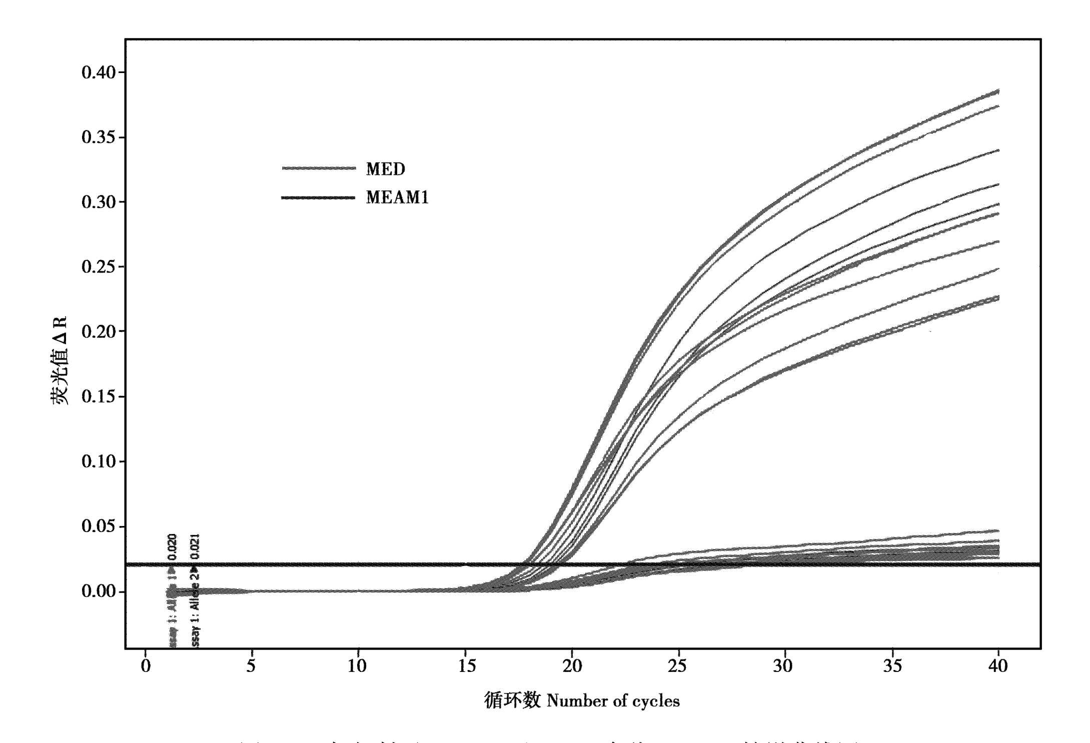


图 1　已知烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种 RT-PCR 扩增曲线图

Fig. 1　Curve of RT-PCR for two cryptic species of *Bemisia tabaci*

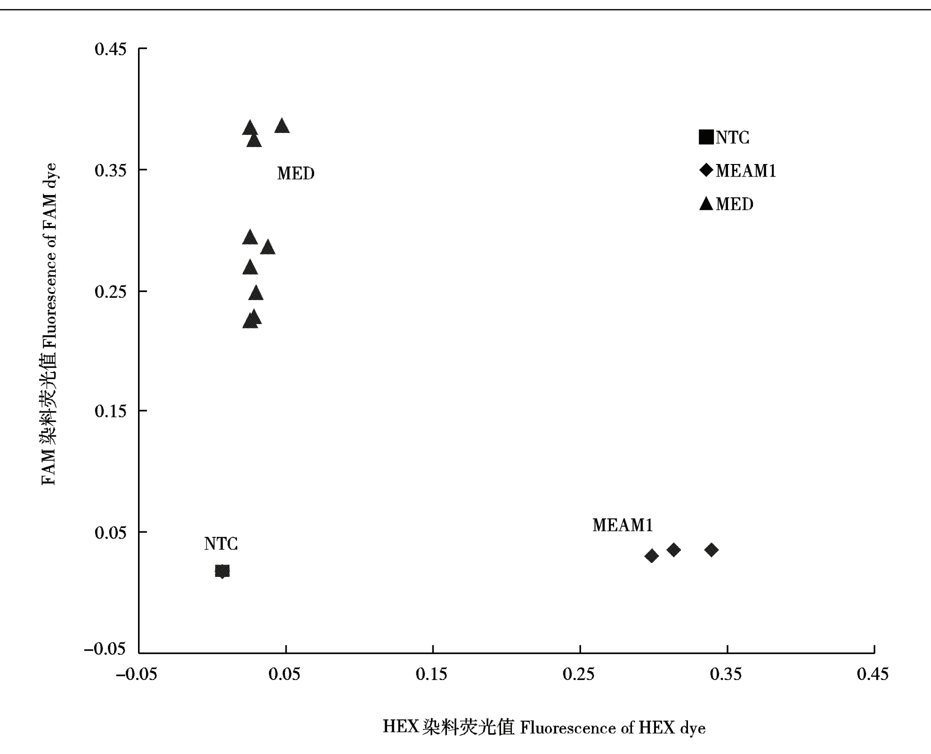


图 2 已知 4 个烟粉虱种群的 TaqMan 荧光数据散点图

Fig. 2 Scatter plot analysis of fluorescence data for 4 known populations of *Bemisia tabaci* in TaqMan assay

NTC：无模板对照（水）No template control (water). 每个种群测定 3 次重复；图 3 同。Three replicates of each population were identified in the test. The same for Fig. 3.

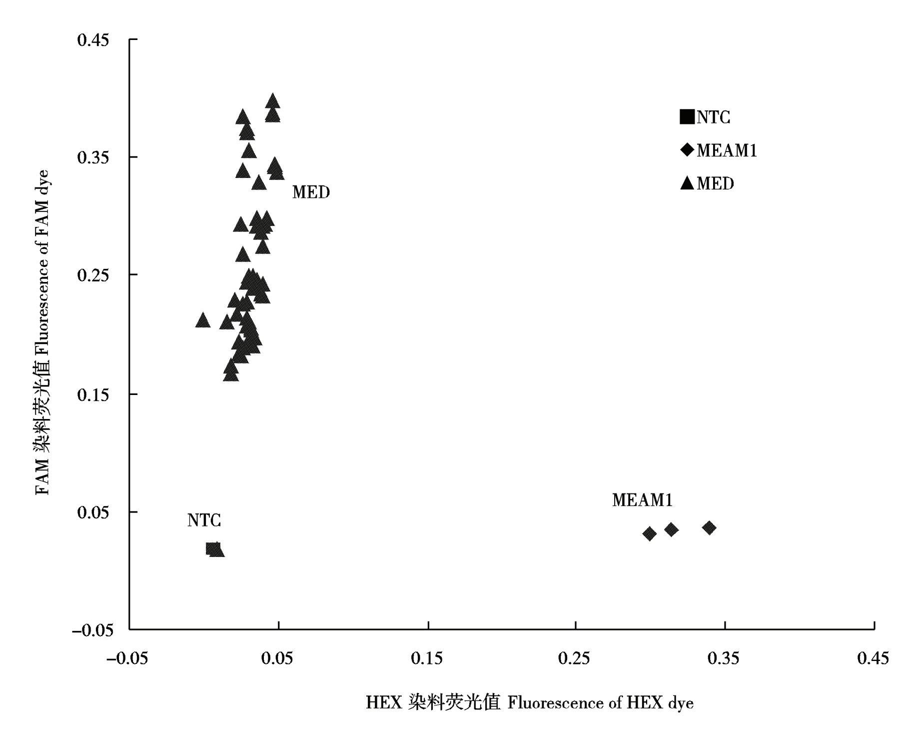


图 3 14 个未知烟粉虱种群的 TaqMan 荧光数据散点图

Fig. 3 Scatter plot analysis of fluorescence data for 14 unknown populations of *Bemisia tabaci* in TaqMan assay

NTC：无模板对照（水）No template control (water).

目前应用于烟粉虱隐种鉴定的分子标记主要有 RAPD，AFLP，rDNA，ITS1 和 mtDNA COI，SSR 和 mtDNA COI PCR-RFLP 等（De Barro *et al*.，2011；Chu *et al*.，2012），其中，mtDNA COI 分子标记为应用较早且较多，亦是最广泛的一种方法（Dinsdale *et al*.，2010），但此种方法操作较复杂，测序费用高，较耗时。因此，迫切需要建立更为快速、准确、且高通量的隐种鉴定方法。本研究应用等位基因聚合酶链式反应技术，借助 TaqMan-MGB 荧光染色标记探针，建立了一种快速、可靠的鉴别烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种方法，并初步对所采集的北京地区 14 个烟粉虱种群进行了隐种鉴定，证明了该方法的可行性和可操作性。本研究为开展我国不同生态区入侵烟粉虱隐种的分布、遗传分化以及种群替代等研究提供了较好的实验技术方法。同时，本研究也对烟粉虱防治策略的选择、抗性监测等综合防治研发工作也提供了很好的技术手段。

参考文献（References）

Chu D, Hu XS, Gao CS, Zhao HY, Nichols RL, Li XC, 2012. Use of mitochondrial cytochrome oxidase I polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for identifying subclades of *Bemisia tabaci* Mediterranean group. *Journal of Economic Entomology*, 105(1): 242 – 251.

Chu D, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu QJ, Zhu GR, 2005. Sequence analysis of mtDNA COI gene and molecular phylogeny of different geographical populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Scientia Agricultura Sinica*, 38(1): 76 – 85.［褚栋，张友军，丛斌，徐宝云，吴青君，朱国仁，2005. 烟粉虱不同地理种群的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学，38(1)：76 – 85］

De Barro PJ, 1995. *Bemisia tabaci* biotype B: a review of its biology, distribution and control. *CSIRO Australia Division of Entomology Technical Paper*, 36: 58.

De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB, 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56: 1 – 19.

Dinsdale A, Cook L, Riginos C, Buckley YM, De Barro P, 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 103: 196 – 208.

Hu J, De Barro P, Zhao H, Wang J, Nardi F, Liu SS, 2011. An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. *PLoS ONE*, 6 (1): e16061.

Jones CM, Gorman K, Denholm I, Williamson MS, 2008. High-throughput allelic discrimination of B and Q biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci*, using TaqMan allele-selective PCR. *Pest Management Science*, 64: 12 – 15.

Jones DR, 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 195 – 219.

Li YL, Li JF, Kang LG, Zhang H, Dong XH, Xu XY, 2010. SNP genotyping of tomato *Mi*-1 gene. *Journal of Northeast Agricultural University*, 41(10): 36 – 42.［李亚玲，李景富，康立功，张贺，董晓慧，许向阳，2010. 番茄 Mi-1 基因的 SNP 分型. 东北农业大学学报，41(10)：36 – 42］

Luo C, Jones CM, Devine G, Zhang F, Denholm I, Gorman K, 2010. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) from China. *Crop Protection*, 29: 429 – 434.

Luo C, Yao Y, Wang RJ, Yan FM, Hu DX, Zhang ZL, 2002. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I (mt COI) gene sequences for the identification of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 45(6): 759 – 763.［罗晨，姚远，王戎疆，阎凤鸣，胡敦孝，张芝利，2002. 利用 mtDNA COI 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. 昆虫学报，45(6)：759 – 763］

Luo C, Zhang JM, Shi BC, Zhang F, Zhang ZL, 2000. Preliminary investigation of host-plant of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in Beijing. *Beijing Agricultural Science*, 18 (Suppl.): 41 – 47.［罗晨，张君明，石宝才，张帆，张芝利，2000. 北京地区烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 寄主植物调查初报. 北京农业科学，18(增刊)：41 – 47］

Mochida K, Yamazaki Y, Ogihara Y, 2003. Discrimination of homologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags. *Molecular Genetics and Genomics*, 270: 371 – 377.

Qiu BL, Coats SA, Ren SX, Idris AM, Xu CX, Brown JK, 2007. Phylogenetic relationships of native and introduced *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) from China and India based on mtCOI DNA sequencing and host plant comparisons. *Progress in Natural Science*, 17: 645 – 654.

Rao Q, Luo C, Zhang H, Guo X, Devine GJ, 2011. Distribution and dynamics of *Bemisia tabaci* invasive biotypes in central China. *Bulletin of Entomological Research*, 101: 81 – 88

Rauch N, Nauen R, 2003. Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54 (4): 165 – 176.

Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES, 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphism in the human genome. *Science*, 280: 1077 – 1082.

Yang YQ, Wang WJ, Xu CB, 2009. Research progress of single nucleotide polymorphism. *Chemistry & Bioengineering*, 26 (8): 19 – 21.［杨永强，王巍杰，徐长波，2009. 单核苷酸多态性研究进展. 化学与生物工程，26(8)：19 – 21］

（责任编辑：袁德成）